Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 15, No.3, Fall 2023, p. 299-315

Using Commercial Tannin-Degrading Bacteria, or Isolated from the Rumen of some Ruminants to Improve the Nutritional Value of Pomegranate Peel

Zahra Jahanara[1], Morteza Chaji[2*], Omid Khorasani[3]

Received: 13-07-2022
Revised: 27-09-2022
Accepted: 10-10-2022
Available Online: 10-10-2022

How to cite this article:
Jahanara, Z., Chaji, M., & Khorasani, O. (2023). Using commercial tannin-degrading bacteria, or isolated from the rumen of some ruminants to improve the nutritional value of pomegranate peel. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(3), 299- 315.
DOI: 10.22067/ijasr.2022.77606.1085

Introduction: Pomegranate has many secondary metabolites such as tannins and phenolic compounds, which have various properties such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and immune system stimulating effects. The amount of tannin in pomegranate skin has been reported up to 20.6%. The limiting effects of tannins can be related to reducing the use of nutrients, especially protein, reducing growth and performance, reducing palatability and feed consumption, and reducing the activity of digestive enzymes. In addition to the anti-nutritional effects in high concentration, the positive impact of dense tannins in optimal concentration includes improving live weight gain, preventing flatulence, increasing milk production, reducing intestinal nematodes, and reducing the production of NH3-N and methane in the rumen. Therefore, the present experiment was carried out to improve the nutritional value of pomegranate peel as a tannin-containing edible material by treating it with some tannase-producing bacteria for ruminants.

Materials and Methods: Pomegranate peel was treated with tannin-degrading bacteria including *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* (isolated from deer rumen), *Lactobacillus fermentum* (isolated from Najdi goat rumen), and commercial *Lactobacillus fermentum*, and its nutritional value including chemical composition, digestibility, and fermentation ability alone (first experiment) or as a combination in a standard fattening lamb diet (second experiment), with two-stage digestion method and gas production test were studied. In the first experiment, five experimental treatments included 1- Pomegranate peel without treatment (control treatment), treatment 2 to 5- Pomegranate peel treated with each of the four tannin-degrading bacteria. The five treatments of the second experiment included 1- Diets containing pomegranate peel without treatment (control treatment), 2-5- Diets containing pomegranate peel treated with each of the four tannin-degrading bacteria.

Results and Discussion: Applying tannin-degrading bacteria reduced the tannin in pomegranate peel ($P<0.05$), which is caused by the tannin-degrading bacteria. In an experiment of ensiling and adding polyethylene glycol and urea to pistachio hull for tannin removal, total tannin decreased. The concentration of total tannin with the potential and rate of gas production, truly decomposed organic matter, microbial biomass production, and microbial biomass production efficiency improved in pomegranate peel treated with tannin-degrading bacteria compared to the control ($P<0.05$). Perhaps the reason for the decrease in gas production potential in the control treatments compared to the treatments treated with bacteria is their higher amount of tannins, because tannins and phenolic substances by forming bonds and complexes with nutrients such as carbohydrates, proteins, reduce the availability of microorganisms. Ruminants to them and as a result reduce their decomposition. Similar to the results of the present experiment, other studies have also shown the positive effect of tannin removal on the improvement of gas production parameters. NH3 concentration and population of protozoa of pomegranate peel treated alone and in the diet increased compared to the control ($P<0.05$). The reason for the increase in NH3 concentration and protozoa population after degrading the tannins with bacteria can be the presence of tannins and polyphenolic compounds in this edible material. By binding to protein and

1- Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.
3- Ph.D. of Animal Nutrition, Kharazmi Industrial School, of Dezful, Iran.
*Corresponding Author's Email: chaji@asnrukh.ac.ir

reducing the rate of protein decomposition, tannins reduce the concentration of NH3, on the other hand, these structures lead to the rupture of the protozoa cell membrane, the inactivation of enzymes, and the reduction of the substrate needed for cell metabolism. The percentage of digestibility of dry matter, NDF, and ADF of pomegranate peel processed alone and in the diet with tannin-degrading bacteria increased compared to the control ($P<0.05$). Due to the reduction of the tannin level by the isolates, the activity of proteolytic enzymes has probably increased, and releasing nutrients from the binding of tannin, has improved the digestibility of the materials. An increase in cell wall digestibility has been reported as a result of treatment with tannin-degrading bacteria in laboratory conditions. Gas production potential and rate, separation coefficient, microbial viable mass production, and microbial viable mass production efficiency were improved in diets containing processed pomegranate peel compared to the control ($P<0.05$).

Conclusion: The use of tannin-degrading bacteria in the processing of pomegranate peel by reducing the tannins concentration led to an increase in the digestion and fermentation potential of pomegranate peel and diets containing pomegranate peel processed with tannins-degrading bacteria compared to the control. Therefore, considering the positive effects of processing pomegranate peel with tannins-degrading bacteria, it can be said that processing it by reducing tannins is a suitable solution to improve its nutritional value.

Keywords: Ammonia nitrogen, Chemical composition, Digestibility, Gas production, Protozoa population, Tannin-decomposing bacteria.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲، ص. ۳۱۵-۲۹۹

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن تجاری یا جدا شده از شکمبه برخی از نشخوارکنندگان برای بهبود ارزش تغذیه‌ای پوست انار

زهرا جهان‌آرا[۱]، مرتضی چاجی[۲*]، امید خراسانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸

چکیده

آزمایش حاضر با هدف بهبود ارزش تغذیه‌ای پوست انار توسط عمل‌آوری آن با باکتری‌های تولیدکننده تاناز، برای نشخوارکنندگان انجام شد. پوست انار با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، *استینتو باکتر* (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (جداسازی شده از شکمبه بز نجدی) و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری عمل‌آوری شدند و ارزش تغذیه‌ای آن به‌تنهایی یا به‌صورت ترکیب در یک جیره استاندارد بره پرواری، با روش هضم دو مرحله‌ای و آزمایش تولید گاز مورد مطالعه قرار گرفت. در آزمایش اول، پنج تیمار آزمایشی شامل: ۱- پوست انار بدون عمل‌آوری (شاهد)، تیمار ۲ تا ۵- پوست انار عمل‌آوری شده با هر یک از چهار باکتری تجزیه‌کننده تانن بودند. تیمارهای آزمایش دوم مانند آزمایش اول بودند با این تفاوت که از پوست انار عمل‌آوری شده در جیره‌های گوسفند پرواری استفاده شد و سپس جیره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. غلظت تانن کل و ماده آلی واقعاً تجزیه شده پوست انار، پتانسیل و نرخ تولید گاز در هر دو آزمایش، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی در هر دو آزمایش در پوست انار عمل‌آوری شده و جیره‌های حاوی آن نسبت به شاهد بهبود یافت. غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآی پوست انار عمل‌آوری شده و جیره‌های حاوی آن نسبت به شاهد افزایش یافت. درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF پوست انار عمل‌آوری شده و جیره‌های حاوی آن نسبت به شاهد افزایش یافت. بنابراین، با توجه به اثرات مثبت فرآوری پوست انار با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن، شاید بتوان گفت عمل‌آوری آن با کاهش تانن راهکاری مناسب برای بهبود ارزش تغذیه‌ای آن باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن، ترکیب شیمیایی، تولید گاز، جمعیت پروتوزوآ، قابلیت هضم، نیتروژن آمونیاکی.

مقدمه

نام علمی انار *Punica granatum* (جنس *پونیکا و گونه گراناتوم*) بوده و از خانواده *پونیکاسه*[۴] است. در اقلیم‌های خشک، نیمه گرمسیری و مدیترانه‌ای رشد می‌کند. بومی ایران، اسپانیا، مصر، روسیه، فرانسه، آرژانتین، چین، ژاپن، آمریکا و هند است (Ozgen *et al.*, 2008). نمونه خودروی انار در گرگان، مازندران، گیلان، کردستان، لرستان و بلوچستان و انواع اصلاح شده آن در مناطق معتدله و معتدله گرم کاشته می‌شود (Mozafarian, 2005). طبق آمارنامه باغداری کشور در سال (۱۳۹۶) سطح زیر کشت انار ۵۱۷۶۷ اصله بوده است که منجر به تولید بیش از ۱۲۰ هزار تن پوست انار در سال می‌شود (Mirzaei-Aghsaghali *et al*., 2011). انار دارای مقادیر زیادی متابولیت ثانویه مانند تانن و ترکیبات فنولیک است که دارای خواص متنوعی از قبیل اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب و تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی هستند (Adams *et al*., 2006). مقدار تانن کل پوست انار تا ۲۰/۶ درصد نیز گزارش شده است (Sharifi and Chaji, 2019a; Sharifi and Chaji, 2019b).

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز- ملاثانی، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز- ملاثانی، ایران.

۳- دکتری تغذیه‌دام، هنرستان خوارزمی دزفول، دزفول، ایران.

(*- نویسنده مسئول: (Email: chaji@asnrukh.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2022.77606.1085

4- Punicacaceae

تانن‌ها به‌عنوان متابولیت ثانویه در نظر گرفته می‌شوند و نقش مستقیمی در متابولیسم گیاهان ندارند و بعد از لیگنین، تانن فراوان ترین گروه فنلی گیاه است (Aguilar *et al*., 2007; Hassan *et al*., 2020). اثرات محدودکنندگی تانن‌ها را می‌توان به کاهش استفاده از مواد مغذی، به‌ویژه پروتئین، کاهش رشد و عملکرد، کاهش خوش‌خوراکی و مصرف خوراک و کاهش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ارتباط داد (Makkar, 2003; Naumann *et al*., 2017; Huang *et al*., 2018). در کنار اثرات ضد تغذیه‌ای در غلظت زیاد، اثر مثبت تانن‌های متراکم در غلظت بهینه شامل بهبود افزایش وزن زنده، جلوگیری از نفخ، افزایش تولید شیر، کاهش کرم‌های گرد (نماتدهای) روده‌ای و کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی و متان در شکمبه می‌باشد (Lim and Murtijaya, 2007; Huang *et al*., 2018). گیاهان و علوفه‌هایی که حاوی مقادیر متوسطی از تانن متراکم هستند (دو تا چهار درصد ماده خشک) می‌توانند اثرات مفیدی بر متابولیسم پروتئین در گوسفند داشته باشند. علاوه‌براین، به سبب تجزیه آهسته پروتئین جیره و تبدیل آن به آمونیاک، عبور پروتئین از شکمبه افزایش می‌یابد و در نتیجه، سبب بهبود و افزایش جذب اسید-های آمینه در روده باریک می‌شود (Hassanat and Benchaar, 2013; Huang *et al*., 2018).

گیاهان و محصولات جانبی زیادی نظیر پوست انار وجود دارند که به‌علت بالا بودن مقدار ترکیبات ثانویه و ضد تغذیه‌ای نظیر تانن استفاده از آن‌ها در خوراک دام، محدودیت دارد (Abbas *et al*., 2019; Sharifi and Chaji, 2019a). استفاده از روش‌هایی که بتواند مقدار این ترکیبات را کاهش دهد، باعث می‌شود بتوان از این ترکیبات خوراکی به‌مقدار بیشتری در خوراک دام استفاده کرد. روش های کاهش تانن شامل فرآوری با خاکستر چوب (منبع ارزان قیمت و قلیایی است)، سیلو کردن و تجزیه بیولوژیکی می‌باشند (Makkar, 2003; Ben Salem *et al*., 2005; Hassanat and Benchaar, 2013; Huang *et al*., 2018).

در کنار روش‌های شیمیایی و سایر روش‌ها برای تانن‌زدایی، روش‌های بیولوژیکی نیز وجود دارد (Mohammadabadi *et al*., 2021). بسیاری از نشخوارکنندگان مانند گاو، گوسفند و بز توانایی بالایی برای هضم گیاهان غنی از تانن دارند. بیشتر ریزجانداران شناسایی‌شده در این حیوانات مانند استرپتوکوکوس‌بویس[1]، *استرپتوکوکوس‌کاپرینوس*، *استرپتوکوکوس‌گالولیتیکوس* که در تجزیه زیستی تانن شرکت دارند، کروی بوده و به جنس *استرپتوکوکوس* تعلق دارند (Hiura *et al*., 2010). در هنگام جداسازی باکتری از شکمبه بزی که منابع غنی از تانن مصرف کرده بود، فعالیت تاناز برای اولین بار شناسایی شد. این آنزیم در گونه *سلونوموناس‌رومینانتیوم* نیز وجود دارد (Pell *et al*., 2000). میکروارگانیسم‌های زیادی دارای پتانسیل تولید تاناز هستند، امّا اساساً از قارچ‌های رشته‌ای جنس *آسپرژیلوس* برای تولید تاناز استفاده شده است. تاناز می‌تواند با شکستن برخی پیوندهای موجود بین پلیمرهای دیواره سلولی، برای تجزیه دیواره سلولی گیاهان نیز استفاده شود (Ahmed and Yang, 2017; Hassan *et al*., 2020).

ریزجانداران شکمبه قادر به تجزیه تانن قابل هیدرولیز می‌باشند؛ بعد از جذب محصولات ناشی از تجزیه آن‌ها توسط دیواره شکمبه و روده و ورود آن‌ها به خون، اگر غلظت ترکیبات فنلی در جریان خون فراتر از ظرفیت سمیت‌زدایی کبد باشد، مسمومیت رخ خواهد داد (Powell *et al*., 2003). تجزیه تانن توسط *کلبسیلا پنومونیه* سویه‌های A1 تا A9 جداسازی شده از شکمبه گوزن (Mohammadabadi *et al*., 2021) و سایر سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* (Kumar *et al*., *2015*)، یا تجزیه تانیک اسید توسط سویه‌های مختلف C2A (Jadhav *et al*., 2011) تأیید شده است. سویه‌های مختلف باکتری *کلبسیلا پنومونیه* از مدفوع بزهای تغذیه شده با جیره‌های غنی از تانن جدا شده است (Tahmourespour *et al*., 2016). سه باکتری با قدرت تولید تاناز و تجزیه‌کننده تانن از جنس کلبسیلا شامل *کلبسیلا واریکولا* سویه PLP G-17 LC (*K. variicola* PLP G-17 LC)، PLP S18 (*K. variicola* PLP S18) و *کلبسیلا پنومونیه* سویه PLP G-17 SC (*K. pneumoniae* PLP G-17 SC) از شکمبه بزها جداسازی شده است (Sharma *et al*., 2017). بنابراین، هدف پژوهش حاضر، استفاده از *لاکتوباسیلوس* و برخی از باکتری‌های تولیدکننده تاناز برای بهبود ارزش تغذیه‌ای پوست انار است که حاوی تانن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های حاضر در آزمایشگاه‌ها و ایستگاه آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. پوست انار خالص فاقد هسته از باغ ملک تهیه و به‌صورت تازه به قطعات ۴-۳ سانتی متری خرد شدند و در سایه در جریان هوای آزاد خشک شدند. آزمایش اول به‌منظور بررسی میزان گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیری در پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن و آزمایش دوم برای بررسی گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیری در جیره بره‌های پرواری حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن انجام شد و از روش تولید گاز (Menke and Steingass, 1988) و هضم دو مرحله‌ای (Tilley and Terry, 1963) به‌منظور انجام این آزمایشات استفاده شد.

باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن مورد استفاده در آزمایش حاضر شامل *کلبسیلا پنومونیه* (10^7 cfu/ml) و گونه‌های مختلف *اسینتو*

1- *Streptococuss bovis*

باکتر (۱۰^۷ cfu/ml) جدا شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (۱۰^۷ cfu/ml) جداسازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری (۱۰^۷ cfu/ml) بودند. توانایی تولید تاناز و تانن‌زدایی آن‌ها در چندین آزمایش بررسی شد (Chaji *et al.*, 2020; Mohammadabadi *et al.*, 2021)

آماده سازی مایع تلقیح باکتری‌ها: یک قسمت از هر جدایه باکتریایی (غیر از فرمنتوم تجاری)، به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی مواد مغذی (نوترینت براث) اضافه شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد، محیط کشت حاصل مجدد به یک لیتر محیط نوترینت براث اضافه شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و برای عمل‌آوری پوست انار استفاده شد (Mohammadabadi *et al.*, 2021).

آماده سازی مایع تلقیح فرمنتوم تجاری: یک بخش از باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی پلیت حاوی محیط کشت MRS – آگار کشت (مرک –آلمان) داده شد، سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن (یک کلنی از باکتری) به محیط کشت MRS منتقل شده و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و برای عمل‌آوری پوست انار استفاده شد (Bahaaldini *et al.*, 2018; Chaji *et al.*, 2020).

تلقیح باکتری به پوست انار: به‌طور خلاصه، مقدار پنج کیلوگرم پوست انار خشک در ۱۰ لیتر آب مقطر حاوی یک لیتر محلول نوترینت براث حاوی باکتری مورد آزمایش (۱۰^۷ cfu/ml) قرار داده شدند و بلافاصله به کیسه‌های پلاستیکی ۱۰ کیلویی منتقل و جهت بی‌هوازی شدن محیط، درب آن‌ها بسته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ روز نگهداری شدند که پس از خارج شدن از کیسه‌ها، خشک و آسیاب شدند و به‌صورت مخلوط با جیره به بره‌ها داده شدند (Chaji *et al.*, 2020; Mohammadabadi *et al.*, 2021).

تیمارهای این دو بخش از آزمایش شامل: تعداد ۱۰ تیمار آزمایشی بود که پنج تیمار آزمایشی مربوط به پوست انار خام یا عمل‌آوری شده با هریک از چهار باکتری تولیدکننده تاناز؛ و پنج تیمار مربوط به جیره‌های حاوی پوست انار خام و عمل‌آوری شده با هر یک از چهار باکتری تولیدکننده تاناز بود. جیره‌های آزمایشی برای بره‌های پرواری (NRC, 2007) و حاوی ۶۰ درصد کنسانتره و ۴۰ درصد علوفه بود (جدول ۱). پنج تیمار آزمایش اول ۱- پوست انار عمل‌آوری نشده، ۲- پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (تعداد معادل ۱۰^۷ cfu) جدا شده از شکمبه گوزن ۳- پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *استینتو باکتر* (تعداد معادل ۱۰^۷ cfu) جداسازی شده از شکمبه گوزن، ۴- پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (تعداد معادل ۱۰^۷ cfu) جدا شده از شکمبه بز نجدی، ۵- پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری؛ و پنج تیمار آزمایش دوم شامل: ۱- جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری نشده ۲- جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (تعداد معادل ۱۰^۷ cfu) جدا شده از شکمبه گوزن ۳- جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *استینتو باکتر* (تعداد معادل ۱۰^۷ cfu) جداسازی شده از شکمبه گوزن، ۴- جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (تعداد معادل ۱۰^۷ cfu) جدا شده از شکمبه بز نجدی، ۵- جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی: ترکیبات شیمیایی پوست انار شامل پروتئین خام (کجلدال خودکار، مدل V50، صنایع آزمایشگاهی بخشی، تهران، ایران)، چربی خام (سوکسله)، ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADFom)، خاکستر و تانن کل (با روش تیترومتری و استفاده از پرمنگنات پتاسیم به‌عنوان محلول تیترکننده) با روش استاندارد اندازه‌گیری شد (AOAC, 2012). الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDFom نیز بدون استفاده از آنزیم آلفا آمیلاز و سولفیت‌سدیم و با حذف خاکستر انجام شد (Van Soest *et al.*, 1991).

آزمایش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری مایع محیط کشت

محیط کشت: مقدار گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیر پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن با روش تولید گاز اندازه‌گیری شد (Menke and Steingass, 1988). قبل از وعده غذایی صبح از چهار راس گوسفند تغذیه شده با جیره علوفه‌ای شامل مخلوط کاه‌گندم، علوفه یونجه، سبوس گندم و دانه‌جو مایع شکمبه گرفته شد و بعد اختلاط بلافاصله توسط پارچه نخی متقال صاف شد. سپس در ظرف آب گرم در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد. در ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری مقدار ۰/۲ گرم نمونه ریخته شد. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر بافر و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه (نسبت ۲ به ۱) به هر ویال اضافه شد. تولید گاز در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت ثبت شد. با استفاده از مدل نمایی تغییر یافته (Orskov and McDonald, 1979) ضرایب تولید گاز محاسبه شد:

$$P = b\,(1 - e^{-ct})$$ معادله (۱)

که در آن، P: تولید گاز، b: پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر)، c: ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t: مدت زمان انکوباسیون (ساعت) و e: عدد نپری بود. فراسنجه‌های تخمیری شامل عامل جداکننده (PF)، ماده آلی واقعاً تجزیه شده، تولید توده زنده میکروبی با معادله‌های ۲ تا ۴ محاسبه شدند: (Blummel *et al.*, 1997)

معادله (۲)

÷ میلی‌گرم ماده آلی واقعا تجزیه شده = (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عامل تفکیک
میلی‌لیتر گاز تولیدی در ۲۴ ساعت

معادله (۳)
× گاز تولیدی در ۲۴ ساعت = (میلی‌گرم) تولید توده زنده میکروبی
(۲/۲- عامل تفکیک)

معادله (۴)
ماده آلـی ÷ تولید توده میکروبی = بازده تولید توده زنده میکروبی واقعاً تجزیه شده

جدول ۱- مواد تشکیل دهنده خوراک و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی حاوی پوست انار

Table 1- Feed ingredients and chemical composition of the experimental diets containing pomegranate peel

اقلام خوراکی (درصد ماده خشک) Ingredients (% of DM)	بدون عمل‌آوری Untreated	عمل‌آوری شده با باکتری[1] Treated[1]
یونجه Alfalfa	15	15
کاه گندم Wheat straw	25	25
دانه جو Barley grain	20	20
دانه ذرت Corn grain	3.5	3.5
کنجاله سویا Soybean meal	15	15
پوست انار Pomegranate peel	20	20
نمک Salt	0.5	0.5
مکمل ویتامین و مواد معدنی [2] Vitamin and mineral supplements[2]	1.0	1.0
ترکیبات شیمیایی Chemical composition (%)		
ماده آلی Organic matter	93.0	93.0
پروتئین خام Crude protein	12.71	12.60
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF[3]	38.60	38.55
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF[3]	26.00	25.95
انرژی متابولیسمی (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) ME[3] (Mcal/kg DM)	2.43	2.43

[1] باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* و *اسینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری.

[2] هر کیلوگرم مکمل ویتامین – مواد معدنی حاوی ۵۰۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰هزار واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۱۸۰ گرم کلسیم، ۶۰ هزار میلی‌گرم، فسفر، ۶۰ هزار میلی‌گرم سدیم، ۱۹ هزار میلی‌گرم منیزیم، سه هزار میلی‌گرم روی، سه هزار میلی‌گرم آهن، ۱۹ هزار میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم سلنیوم، یک میلی‌گرم کروم، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۴۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدانت.

[1] Tannins-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.

[2] Premix contained (per kg): Vitamin A, 500,000 IU/mg; vitamin D_3, 100000 IU/mg; vitamin E, 100 mg/kg; Ca, 180 g/kg; P, 60000 mg/kg; Na, 60000 mg/kg; Mg, 19000 mg/kg; Zn, 3000 mg/kg; Fe, 3000 mg/kg; Mn, 19000 mg/kg; Cu, 300 mg/kg; Co, 100 mg/kg; Se, 1 mg/kg; I, 100 mg/kg; antioxidant, 400 mg/kg; carrier, up to 1000 g.

[3]NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, ME: Metabolizable energy

آزمایش هضم دو مرحله‌ای: قابلیت هضم مواد مغذی پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن به‌روش هضم دو مرحله‌ای تعیین شدند. مایع شکمبه مانند آزمایش تولید گاز تهیه شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ۴۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی مخلوط شدند (نسبت ۱ به ۴) و در لوله‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در بن ماری ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شد (Tilley and Terry, 1963). در ۴۸ ساعت بعد، به محیط کشت شش میلی‌لیتر اسید کلریدیک ۲۰ درصد و پنج میلی‌لیتر آنزیم پپسین اضافه شد (۰/۵ گرم آنزیم پپسین ۳۳۰۰ در ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال). لوله‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت دیگر در حمام آب گرم قرار داده شدند. در پایان روز چهارم، از اختلاف وزن نمونه اولیه و باقی‌مانده، پس از خشک کردن آن‌ها در آون (۹۰ درجه سلسیوس، ۲۴ ساعت) قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF اندازه‌گیری شد.

شمارش پروتوزوآ: جهت شمارش پروتوزوآ، پس از تهیه مایع محیط کشت در آزمایش تولید گاز، برای ثابت کردن پروتوزوآ، ۱۰ میلی‌لیتر مایع محیط کشت با ۱۰ میلی‌لیتر فرم آلدهید ۱۰ درصد مخلوط و با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش پروتوزوآها انجام شد (Dehority, 2003).

تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه: به‌منظور تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌برداری از مایع محیط کشت در آزمایش تولید گاز انجام شد، بلافاصله pH آن با دستگاه pH متر (مدل WTW 3110، ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد. پس از صاف کردن با پارچه متقال چهار لایه به‌مقدار مساوی با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (۱۶/۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک مرک ۳۷ درصد در یک لیتر آب مقطر) مخلوط شد و جهت اندازه‌گیری بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع محیط کشت با روش فنل- هیپوکلراید با دستگاه اسپکتوفتومتر (Bio-Rad, Libra S22, England) اندازه‌گیری شد (Brodrick and Kang, 1980).

تجزیه و تحلیل آماری: همه‌ی داده‌های حاصل با نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴) با مدل خطی GLM در قالب یک طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ درصد انجام گرفت. از مدل آماری زیر استفاده شده است

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{(۴) معادله}$$

که در آن، Y_{ij}: مقدار مشاهده شده، μ: میانگین جامعه، Ti: اثر تیمار iام و ε_{ij}: خطای آزمون است.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌ها

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری پوست انار غیر از تانن تأثیری بر ترکیب شیمیایی اندازه‌گیری شده در آزمایش حاضر نداشت (جدول ۲) و غلظت تانن کل کاهش یافت (P<۰/۰۵). نزدیک به نتایج پژوهش حاضر غلظت NDF و ADF پوست انار عمل‌آوری نشده به‌ترتیب ۳/۶، ۲۰/۸، ۱۵/۱ (Mirzaei-Aghsaghali *et al*., 2011) و مقدار تانن کل آن ۵/۴ درصد بود (Khorsandi *et al*., 2011). دلیل اختلاف در نتایج می‌تواند ناشی از شرایط آب هوایی منطقه جغرافیایی و محل رویش انار و زمان برداشت باشد (Brooker and Kleinig, 2006; Taher-Maddah *et al*., 2012). موافق با نتایج آزمایش حاضر، در مطالعه‌ای سیلو کردن پوست پسته با پلی اتیلن گلیکول یا اوره به‌منظور کاهش تانن، به‌جز غلظت تانن، ترکیبات شیمیایی تغییر معنی‌داری نکردند (Mokhtarpour *et al*., 2012). در آزمایش حاضر نیز غلظت ماده خشک، پروتئین خام، NDF و ADF در پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن نسبت به شاهد (پوست انار بدون عمل‌آوری) تغییر معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری پوست انار باعث کاهش معنی‌دار غلظت تانن شد (جدول ۲) و بیشترین غلظت تانن در شاهد مشاهده شد. علت کاهش تانن تجزیه آن توسط باکتری های تجزیه‌کننده تانن می‌باشد(Pell *et al*., 2000) . در آزمایشی، سیلو کردن و اضافه کردن پلی اتیلن گلیکول و اوره (همه برای تانن‌زدایی) به پوست پسته، کل تانن را به‌مقدار ۱۹/۷۵ درصد کاهش داد(Mokhtarpour *et al*., 2012) . تخمیر کنجاله کانولای فرآوری شده (Safari *et al*., 2012) و مغز میوه بلوط با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث کاهش تانن نسبت به شاهد شد (Bahaaldini *et al*., 2018). عمل‌آوری آرد سورگوم با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم + ساکارومایسز سرویسیا* یا *ریزوپوس الیگوسپروس* به‌ترتیب ۳۳/۶۹ و ۴۴/۶۵ درصد تانن را کاهش داد که به سبب آنزیم‌های تاناز و فیتاز تولید شده توسط این ریزجانداران بود (Setiarto and Widhyastuti, 2016).

جدول ۲- ترکیب شیمیایی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

Table 2- Chemical composition of pomegranate peel and diets containing pomegranate peel treated with tannins-degrading bacteria

ماده مغذی (٪) Nutrient (%)	تیمارها Treatment					SEM	*P-value*
		باکتری‌های مورد استفاده برای عمل‌آوری[۱] Bacteria used for treating[1]					
	شاهد Control[2]	*کلبسیلا پنومونیه* *Klebsiella pneumoniae*	*اسینتو باکتر* *Acinetobacter*	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده *Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری* *Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
ماده خشک Dry matter	68.50	70.900	70.75	69.20	69.50	0.960	0.40
پروتئین خام Crude protein	2.95	2.40	2.85	2.87	2.83	0.416	0.50
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF[3]	25.74	25.47	25.73	25.73	25.63	0.409	0.90
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF[3]	19.70	19.40	19.64	19.61	19.62	0.471	0.90
تانن کل Total tannins	12.47[a]	8.31[b]	8.63[b]	8.40[b]	8.45[b]	0.580	0.03

[۱] باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* و *اسینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری*.

[۲] پوست انار عمل‌آوری نشده.

[a-b] تفاوت میانگین‌های در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Tannins-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.

[2] Control: untreated pomegranate peel,

[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).

[3] NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber

SEM: Standard error of means;

پتانسیل و نرخ تولید گاز پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن (*کلبسیلا پنومونیه*، گونه‌های مختلف *استینتو باکتر*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جداشده از شکمبه بز) در عمل‌آوری پوست انار به‌عنوان ماده خوراکی تانن‌دار، باعث افزایش (P<۰/۰۵) پتانسیل و نرخ تولید گاز پوست انار نسبت به شاهد (پوست انار بدون عمل‌آوری) شد (جدول ۳).

عمل‌آوری پوست انار با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن تأثیر معنی‌داری بر پتانسیل و نرخ تولید گاز جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده نسبت به جیره شاهد داشت (جدول ۳). پتانسیل تولید گاز همه جیره‌ها نسبت به شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). بیشترین پتانسیل تولید گاز در جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با *کلبسیلا پنومونیه* و *استینو باکتر* مشاهده شد، از بین این دو نیز *کلبسیلا پنومونیه* بیشترین مقدار را داشت.

شاید دلیل کاهش پتانسیل تولید گاز در تیمارهای بدون عمل آوری نسبت به تیمارهای عمل‌آوری شده با باکتری مقدار تانن بیشتر آن‌ها باشد، زیرا تانن‌ها و مواد فنلی با تشکیل پیوند و کمپلکس با مواد مغذی شامل کربوهیدرات، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، غشای سلولی باکتری و آنزیم‌های هضم‌کننده پروتئین و کربوهیدرات باعث کاهش دسترسی ریزجانداران شکمبه به آن‌ها و در نتیجه، کاهش تجزیه آن‌ها می‌شود (Patra and Saxena, 2010; Abarghoyi and Rouzbehan, 2015; Sharifi *et al*., 2019). لذا، افزایش تولید گاز در تیمارهای عمل‌آوری شده نشان‌دهنده تأثیر باکتری تولیدکننده تاناز در کاهش مقدار تانن در پوست انار به سبب تجزیه تانن است. اثرات مهاری تانن‌های متراکم قابل استخراج گیاه لوسنا (Tan *et al*., 2011)، بر فعالیت سویه‌های مختلف باکتری‌های تولیدکننده متان و مهار تولید متان به اثبات رسیده است. در آزمایشی، با اسپرس آبی و دیم (منابع غنی از تانن)، نتایج نشان داد که تانن‌زدایی اسپرس آبی با

آب و اوره، باعث افزایش پتانسیل و نرخ تولید گاز نسبت به شاهد (اسپرس آبی عمل‌آوری یا تانن‌زدایی نشده) (yarahmadi et al., 2017) شد.

جدول ۳- پتانسیل و نرخ تولید گاز پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

Table 3- Potential and rate of gas production of pomegranate peel and diets containing pomegranate peel treated with tannins-degrading bacteria

متغیرها Variables	تیمارها / Treatment					SEM	*P-value*
	شاهد Control[2]	باکتری‌های مورد استفاده برای عمل‌آوری[1] / Bacteria used for treating[1]					
		کلبسیلا پنومونیه *Klebsiella pneumoniae*	*اسینتو باکتر* *Acinetobacter*	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده *Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* *تجاری* *Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
پوست انار Pomegranate peel							
پتانسیل تولید گاز Gas production potential (ml)	53.03[b]	67.44[a]	61.37[a]	65.64[a]	68.22[a]	3.44	0.04
نرخ تولید گاز Gas production rate (ml/h)	0.02[b]	0.04[a]	0.05[a]	0.04[a]	0.05[a]	0.005	0.13
جیره حاوی پوست انار Diets containing pomegranate peel							
پتانسیل تولید گاز Gas production potential (ml)	55.77[c]	91.41[a]	91.45[a]	75.34[b]	81.60[ab]	6.14	0.003
نرخ تولید گاز Gas production rate (ml/h)	0.05[b]	0.05[b]	0.05[b]	0.07[ab]	0.10[a]	0.012	0.047

[۱] باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* و *اسینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری*.

[۲] پوست انار عمل‌آوری نشده و جیره‌های حاوی آن

[a-b] تفاوت میانگین‌های در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1]Tannins-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.

[2] Untreated pomegranate peel and diets containing it.

[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).

SEM: Standard error of means

سایر فراسنجه‌های تخمیری پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکترهای تجزیه‌کننده تانن

تأثیر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری پوست انار (جدول ۴) بر ماده آلی واقعاً تجزیه شده، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و بیشترین مقدار در پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* و کمترین آن در شاهد بود. اختلاف بین تیمارها از لحاظ مقدار PF پوست انار معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

اثر عمل‌آوری پوست انار با باکتری‌های تولیدکننده تانن بر فراسنجه‌های تخمیری جیره‌های حاوی پوست انار در جدول ۴ نشان داده شده است. عمل‌آوری با باکتری تأثیر معنی‌داری بر ماده آلی واقعاً تجزیه شده، تولید توده زنده میکروبی، بازده تولید توده زنده میکروبی جیره‌های حاوی پوست انار داشت و باعث بهبود آن‌ها شد (P>۰/۰۵)؛ امّا تأثیری بر PF نداشت.

فعالیت ضد میکروبی تانن‌ها مربوط به تداخل با آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده و دیواره سلولی (تغییرات مورفولوژیکی در دیواره سلولی آن‌ها)، بی‌ثباتی غشای سیتوپلاسمی و پلاسمایی و اثر مستقیم بر متابولیسم میکروبی از طریق مهار چرخه فسفوریلاسیون- اکسیداتیو بوده و با محدود کردن سوبسترا جهت رشد میکروبی و باند

کردن کاتیون‌ها، فراهمی آن‌ها را بـرای ریزجانـداران را کـاهش مـی دهند. (patra and Saxena, 2010). به‌علاوه، باعث کاهش اتصـال میکروبی به ذرات خوراک، کاهش رشـد میکروبـی و کـاهش فعالیـت آنزیم‌هـای میکروبـی مـی‌شـود؛ در واقـع، تـانن‌هـا بـا مهـار فعالیـت ریزجانداران و یا آنزیم‌های میکروبی بازده تخمیر شکمبه‌ای را کاهش می‌دهند (Makkar, 2003). لذا، شاید دلیـل بهبـود فراسـنجه‌هـای تخمیـری در آزمـایش حاضـر در حـین عمـل‌آوری بـا بـاکتری‌هـای تولیدکننده تاناز، تجزیه تـانن و از بـین بـردن اثـرات منفـی آن باشـد (جدول ۲).

جدول ٤– فراسنجه‌های تخمیری تولید گاز پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

Table 4- Fermentative parameters of gas production of pomegranate peel and diets containing pomegranate peel treated with tannins-degrading bacteria

متغیرها Variables	تیمارها Treatment					SEM	*P-value*
	شاهد Control[2]	باکتری‌های مورد استفاده برای عمل‌آوری[۱] Bacteria used for treating[1]					
		کلبسیلا پنومونیه *Klebsiella pneumoniae*	*اسینتو باکتر* *Acinetobacter*	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده *Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* *تجاری* *Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
پوست انار Pomegranate peel							
ماده آلی واقعاً تجزیه شده TOMD[۳] (mg)	152.55[b]	173.90[a]	156.05[b]	152.35[b]	163.55[ab]	4.59	0.04
عامل تفکیک PF[3] (mg/ml)	4.97	7.20	5.27	5.50	5.43	1.02	0.64
تولید توده زنده میکروبی MB[3] (mg)	71.38[b]	118.88[a]	71.61[b]	86.96[b]	94.78[b]	14.36	0.029
بازده تولید توده زنده میکربی MBE[3] (%)	46.01[b]	68.17[a]	46.63[b]	57.06[b]	57.56[b]	8.56	0.45
جیره حاوی پوست انار Diets containing pomegranate peel							
ماده آلی واقعاً تجزیه شده TOMD[3] (mg)	159.85[b]	172.30[a]	158.05[b]	178.30[a]	185.15[a]	4.48	0.032
عامل تفکیک PF[3] (mg/ml)	3.45	3.77	3.56	3.91	4.76	0.621	0.62
تولید توده زنده میکروبی MB[3] (mg)	53.85[c]	71.50[b]	59.84[bc]	77.50[a]	90.48[a]	4.29	0.045
بازده تولید توده زنده میکروبی MBE[3] (%)	31.77[c]	41.44[b]	37.98[bc]	43.04[b]	52.15[a]	4.50	0.68

[۱] باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* و *اسینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شـده از شـکمبه بـز نجـدی و *لاکتـو باسـیلوس فرمنتـوم تجاری*.

[۲] پوست انار عمل‌آوری نشده و جیره‌های حاوی آن

[a-b] تفاوت میانگین‌های در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Tannins-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.

[2] Untreated pomegranate peel and diets containing it.

[3] TOMD: Truly organic matter degradability; PF: partitioning factor; MB: microbial biomass production; MBE: microbial biomass production efficiency.

[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).

SEM: Standard error of means.

مشابه با نتایج آزمایش حاضر، سایر پژوهش‌ها نیز اثر مثبت تانن‌زدایی بر بهبود فراسنجه‌های تولید گاز را نشان داده‌اند؛ در آزمایشی تانن‌زدایی اسپرس آبی با آب و اوره باعث افزایش میزان ماده آلی واقعاً تجزیه شده، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی و PF شد (Yarahmadi *et al.*, 2017) بنابراین، در آزمایش حاضر افزایش ماده آلی واقعاً تجزیه شده، توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی در تیمار پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده در مقایسه با شاهد، نشان‌دهنده تأثیر باکتری‌های تولیدکننده تاناز و اثرات مثبت تانن‌زدایی است.

قابلیت هضم آزمایشگاهی پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن برای عمل‌آوری پوست انار اثر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF آن داشت (P<۰/۰۵). قابلیت هضم مواد مغذی پوست انار در همه تیمارها بیشتر از شاهد بود. بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF پوست انار مربوط به عمل‌آوری با باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از بز و کمترین در شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵).

اثر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری پوست انار بر قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF جیره‌های حاوی پوست انار معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک مربوط به جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم جداشده از بز* بود (جدول ۵). قابلیت هضم ماده خشک در همه جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده از شاهد بیشتر بود و غیر از تیمار *اسینتوباکتر* اختلاف همه آن‌ها با شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیشترین درصد قابلیت هضم NDF و ADF جیره‌های حاوی پوست انار مربوط به تیمار عمل‌آوری با *کلبسیلا پنومونیه* بود. قابلیت هضم NDF در همه جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن به‌طور معنی‌داری از شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). قابلیت هضم ADF جیره حاوی پوست انار نیز در همه تیمارها به‌جز تیمار *اسینتوباکتر* که از نظر عددی بیشتر بود، به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵).

به دلیل کاهش سطح تانن توسط جدایه‌ها، فعالیت آنزیم‌های پروتئولتیک نیز احتمالاً افزایش پیدا کرده و با رهاسازی مواد مغذی از اتصال تانن، بهبود قابلیت هضم مواد را به همراه داشته است (Makkar, 2003; Goel *et al.*, 2012). تانن‌ها در غلظت بالا بسته به نوع، اثرات مهاری مهمی بر جمعیت باکتری‌های فیبرولتیک شکمبه دارند که منجر به کاهش هضم الیاف و قابلیت هضم آن می شوند (Goel *et al.*, 2005). در این ارتباط گزارش شده با افزایش مقدار تانن در جیره، جمعیت کل باکتری‌ها، باکتری‌های *فیبروباکترسوکسینوژنز، رومینوکوکوس آلبوس* و *رومینوکوکوس فلاوفیشن* کاهش یافت (McSweeney *et al.*, 2001; Sharifi *et al.*, 2019) معمولاً ترکیبات فنولی سبب کاهش قابلیت هضم دیواره سلولی، پروتئین و کربوهیدرات‌ها می‌شوند (Ben Salem *et al.*, 2005; Naumann *et al.*, 2017; Huang *e al.*, 2018). افزودن چهار درصد پوست انار به جیره گاوهای شیری باعث کاهش قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، پروتئین، چربی، فیبر خام و NFE شد (Abbas *et al.*, 2019). استفاده از عصاره پوست انار در جیره بره‌های پرواری تأثیری بر قابلیت هضم مواد مغذی (ماده خشک، ماده آلی، NDF و ADF) نداشت، امّا در مقایسه با شاهد (فاقد عصاره پوست انار) قابلیت هضم پروتئین خام کاهش یافت (Sharifi and Chaji, 2019a). تخمیر کنجاله کانولای فرآوری شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌طور متوسط موجب افزایش معنی‌دار ۳/۶ درصدی پروتئین حقیقی و کاهش معنی‌دار ۴۴/۵ درصدی تانن نسبت به شاهد شد که این کاهش تانن منجر به افزایش قابلیت هضم آزمایشگاهی پروتئین شد (Safari *et al.*, 2012). افزایش قابلیت هضم دیواره سلولی در نتیجه عمل‌آوری با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Mohammadabadi *et al.*, 2021). در مطالعه‌ای قابلیت تجزیه و ناپدید شدن ماده خشک با افزایش سطوح تانن کاهش یافت (Tan *et al.*, 2011). زمانی که کشت خالص باکتری *استرپتوکوکوس کاپرینوس* (تجزیه‌کننده تانن) به شکمبه گوسفند وارد شد، باعث افزایش قابلیت هضم مواد مغذی، جذب نیتروژن و مصرف ماده خشک شد(Brooker *et al.*, 1994) . لذا، با توجه به نتایج آزمایش حاضر با کاهش تانن توسط باکتری‌ها، فعالیت آنزیم‌های سلولایتیک افزایش یافته است و این می‌تواند دلیلی برای افزایش قابلیت هضم ماده خشک و NDF باشد.

غلظت نیترون آمونیاکی و pH محیط کشت در آزمایش تولید گاز برای پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

تأثیر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن برای عمل‌آوری پوست انار بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH در همه تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد بیشتر بود (جدول ۶). بیشترین غلظت نیتروژن آمونیاکی مربوط به تیمار پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بود که با سایر تیمارهای حاوی باکتری غیر از *اسینتوباکتر* و شاهد تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). مقدار pH

محیط کشت در همه تیمارهای عمل‌آوری شده با باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار pH در پوست انار مربوط به عمل‌آوری *فرمنتوم جدا شده* از شکمبه بز بود که تنها با تیمار *کلبسیلا پنومونیه* تفاوتی نداشت؛ و کمترین در شاهد مشاهده شد. اثر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن برای عمل آوری پوست انار بر غلظت نیتروژن آمونیاکی جیره‌های حاوی پوست انار معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). برای همه جیره‌های حاوی پوست انار، افزودن باکتری تانن‌زدا باعث افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شد (جدول ۶). بیشترین غلظت نیتروژن آمونیاکی مربوط به عمل‌آوری با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم جدا شده شکمبه بز* بود و کمترین در شاهد مشاهده شده است. بیشترین مقدار pHدر جیره‌های حاوی پوست انار در تیمار حاوی فرمنتوم تجاری مشاهده شد.

جدول ۵- قابلیت هضم آزمایشگاهی پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

Table 5- *In vitro* digestibility of pomegranate peel and diets containing pomegranate peel treated with tannins-degrading bacteria

متغیرها (٪) Variables (%)	تیمارها Treatment					SEM	*P-value*
		باکتری‌های مورد استفاده برای عمل‌آوری[۱] Bacteria used for treating[1]					
	شاهد Control[2]	*کلبسیلا پنومونیه* *Klebsiella pneumoniae*	*اسینتو باکتر* *Acinetobacter*	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده *Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری* *Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
پوست انار Pomegranate peel							
ماده خشک Dry matter	65.07^{b}	69.49^{a}	72.15^{a}	75.02^{a}	73. 76^{a}	2.02	0.040
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF[۳]	60.27^{c}	61.76^{bc}	61.67^{bc}	67.02^{a}	64.24^{ab}	0.968	0.002
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF[۳]	58.44^{b}	59.75^{ab}	59.16^{b}	62.97^{a}	62. 93^{a}	1.09	0.030
جیره حاوی پوست انار Diets containing pomegranate peel							
ماده خشک Dry matter	64.06^{c}	66.27^{b}	65.54^{bc}	70.14^{a}	69.70^{a}	0.82	0.03
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF[۳]	57.59^{b}	61.49^{a}	60.22^{a}	60.98^{a}	59.82^{a}	0.850	0.01
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF[۳]	54.45^{b}	59.79^{a}	55.40^{b}	57.37^{a}	56.81^{a}	0.720	0.009

[۱]باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* و *اسینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری*.

[۲] پوست انار عمل‌آوری نشده و جیره‌های حاوی آن

a-b تفاوت میانگین‌های در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Tannins-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.

[2] Untreated pomegranate peel and diets containing it.

[3] NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber

[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).

SEM: Standard error of means

جدول ٦– تأثیر عمل‌آوری پوست انار با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن بر غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH و جمعیت پروتوزآ (۱۰^۴×) در آزمایش تولید گاز

Table 6- Effect treating of pomegranate peel with tannins-degrading bacteria on the concentration of ammonia nitrogen, ruminal pH, and protozoa population ($\times 10^4$) in gas production experiment

متغیرها Variables	تیمارها Treatment					SEM	*P-value*
		باکتری‌های مورد استفاده برای عمل‌آوری[۱] Bacteria used for treating[1]					
	شاهد Control[2]	*کلبسیلا پنومونیه* *Klebsiella pneumoniae*	*اسینتو باکتر* *Acinetobacter*	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جداسازی شده *Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری* *Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
پوست انار Pomegranate peel							
نیتروژن آمونیاکی NH_3-N (mg/dl)	20.85[b]	35.63[a]	25.28[a]	21.35[b]	24.26[b]	1.98	0.0001
pH	6.30[d]	6.52[ab]	6.43[c]	6.55[a]	6.48[bc]	0.167	0.0008
کل پروتوزاها Total protozoa	9.50[b]	10.0[b]	9.75[b]	13.50[a]	10.75[b]	0.459	0.002
جیره حاوی پوست انار Diets containing pomegranate peel							
نیتروژن آمونیاکی NH_3-N (mg/dl)	17.96[d]	23.33[b]	22.57[c]	28.22[a]	22.01[c]	0.05	0.0001
pH	6.31[c]	6.42[b]	6.40[b]	6.40[b]	6.51[a]	0.012	0.0007
کل پروتوزاها Total protozoa	9.50[c]	14.50[a]	9.50[c]	12.50[b]	11.50[b]	0.500	0.003

[۱] باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلبسیلا پنومونیه* و *اسینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، لاکتو باسیلوس فرمنتوم جداسازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری.

[۲] پوست انار عمل‌آوری نشده و جیره‌های حاوی آن

[a-b-c] تفاوت میانگین‌های در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Tannins-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.

[2] Untreated pomegranate peel and diets containing it.

[a,b,c] Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P < 0.05$).

SEM: Standard error of means;

دلیل کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شاهد و افزایش آن پس از تانن‌زدایی با باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش حاضر، می‌تواند وجود تانن و ترکیبات پلی‌فنلی در این ماده خوراکی باشد. تانن‌ها با اتصال به پروتئین و کاهش نرخ تجزیه‌پذیری پروتئین سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌شوند (Ben Salem *et al*., 2005). تلقیح باکتری *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس کاپرینوس* به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن با استفاده از مایع شکمبه بزهای فرال به گوسفندان تغذیه شده با آکاسیا (حاوی تانن)، سبب بهبود قابلیت هضم پروتئین شد (Min *et al*., 2003; Min *et al*., 2015). در آزمایش دیگری نیز تلقیح باکتری‌های مقاوم به تانن (تانن‌زدا) به بزهای فرال استرالیایی، جیره‌های حاوی *آکاسیا آنئورا* (حاوی ۲۵–۵ درصد تانن متراکم) را به‌طور مطلوب‌تری نسبت به گوسفندان تحمل کردند و با تجزیه تانن منجر به هضم بیشتر پروتئین حین انکوبه کردن خوراک با مایع شکمبه گرفته شده از گوسفندان تغذیه شده با *آکاسیا آنئورا* شدند. تلقیح شکمبه‌ای باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت مقاوم به تانن به گوسفندان تغذیه شده با پوست بادام زمینی (۷/۱ درصد تانن متراکم)، نسبت به گروه شاهد اثر مطلوبی بر هضم پروتئین، کاهش دفع نیتروژن و تعادل نیتروژن داشت (Molina *et al*., 2009). نتایج آزمایش حاضر یافته‌های این پژوهشگران را تأیید می‌کند، به‌طوری‌که افزودن باکتری‌های تانن‌زدا در آزمایش حاضر باعث افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه شد که به مفهوم افزایش تجزیه پروتئین در اثر تجزیه تانن است (جدول ۶). بیان کردند که استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در جیره حاوی انجیر سفید تأثیری بر pH شکمبه‌ای نداشت (Chaudhary *et al*., 2011). در مطالعه‌ای، غلظت نیتروژن آمونیاکی در گاوهای تغذیه شده با سیلاژ محصولات فرعی پسته (حاوی تانن) در مقایسه با

کنترل کـاهش یافـت_(Mokhtarpour *et al*., 2012) عمـل‌آوری مکمل‌های پروتئینی با تانن سبب کاهش معنی‌دار نیتـروژن آمونیـاکی شد (Sharifi *et al*., 2019). دلیل کاهش جمعیت پروتوزوآ در شاهد (بدون عمل‌آوری) و افزایش آن در حین عمـل‌آوری بـا بـاکتری‌هـای تانن‌زدا احتمالا ساختار پلی فنولی (نظیر تانن‌ها) موجـود در ایـن مـواد خوراکی می‌باشد. این ساختارها منجر بـه پـاره شـدن غشـای سـلول پروتوزوآ، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و کاهش سوبسترا و یون‌هـای فلـزی مورد نیاز بـرای متابولیسـم سـلولی مـی‌شـود (Goal *et al*., 2005). افزودن مکمل پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان یک باندکننده تـانن سـبب افـزایش تعـداد پروتـوزوآ شـد (Yanez Ruiz *et al*., 2004; Abarghuei *et al*., 2010). این تأییدکننده فرضیه اثر منفی تـانن و ترکیبات پلی فنلی بر جمعیت پروتوزوآ است. در پژوهشی، تـانن‌زدایـی گیاه کنوکارپوس با بـاکتری‌هـای تولیـدکننـده تانـاز (*اسـینتو بـاکتر* و *کلبسیلا پنومونیه*) تعداد جمعیت پروتوزوآی شکمبه بره‌های پرواری را نسبت به شاهد (حاوی گیاه کنوکارپوس عمل‌آوری نشده) افـزایش داد (Eydipour *et al*., 2019). کـاهش کمتـر pH در تیمارهـای عمل‌آوری شده با باکتری نسبت به تیمارهای حاوی پوست انار بـدون عمل‌آوری، نشان‌دهنده تجزیه تانن توسط آن‌ها و کاهش اثر تانن بر pH در تیمارهای حاوی باکتری می‌باشد. شاید دلیـل کـاهش pH در شاهد (بدون عمل‌آوری) تولیـد اسـیدهای چـرب فـرار در اثـر تجزیـه ترکیبات فنولی باشد که می‌تواند سطح pH شـکمبه را کـاهش دهـد (Saha and Ghosh, 2019). استفاده از منابع تانن‌داری نظیـر تفالـه انگور در جیره گوسفند (Abarghuei *et al*., 2010)، عصـاره پوسـت انار در جیـره گاوهـای شـیرده (Abarghuei *et al*., 2013) و انـواع منابع تانن‌دار در جیره گاوهـای گوشـتی (Orzuna-Orzuna *et al*., 2021) باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیـت پروتـوزوآی شکمبه شد، امّا تأثیری بـر pH شـکمبه نداشـتند. اسـتفاده از عصـاره پوست انار در جیره باعث کاهش معنی‌دار غلظـت نیتـروژن آمونیـاکی مایع شکمبه بره‌های پرواری شد، امّا تأثیری بر pH مایع شکمبه آن‌ها نداشت (Sharifi and Chaji. 2019a; Sharifi *et al*., 2019).

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری پوست انـار با کاهش غلظت تانن، منجر به افزایش پتانسیل هضم و تخمیر پوست انار و جیره‌های حاوی پوست انـار عمـل‌آوری شـده بـا بـاکتری‌هـای تجزیه‌کننده تانن نسبت به شاهد (پوست انار بـدون عمـل‌آوری) شـد. بنابراین، نتایج این مطالعه نشان داد، استفاده از باکتری‌های تولیدکننده تاناز با تجزیه تانن کیفیت خوراک‌های دارای تانن را بهبود می‌بخشند، لذا استفاده از آن‌ها راه‌کاری مناسبی برای کاهش تانن می‌باشد. از بین باکتری‌های تولیدکننده تاناز مورد استفاده در آزمایش حاضر، اگرچه در برخی موارد اختلافی در عملکرد باکتری‌ها با هم مشاهده نشد، با ایـن حال، بهترین نتایج مربوط به عمل‌آوری پوست انار با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از شکمبه گوزن و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از شکمبه بز بود. برای اطمینان از نتایج توصیه می‌شود، آزمایش‌هایی با بره‌های پرواری یا سایر گونه‌های نشخوارکنندگان انجـام شـود و در آن از این باکتری‌ها برای عمل‌آوری پوست انار یا سایر مـواد تـانن‌دار استفاده شود و اثر آن بر عملکرد هضمی، تخمیـری، رشـد و تولیـدات مختلف بررسی شود.

References

1. Abarghoyi, M., & Rouzbehan, Y. (2015). The effects of several levels of grape pomace extract on *in vitro* intestinal digestibility of dairy cow. *Animal Sciences Journal*, *28*(106), 13-28.
2. Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., & Alipour, D. (2010). The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, *132*, 73–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.002.
3. Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., Salem, A. Z. M., & Zamiri, M. J. (2013). Nutrient digestion, ruminal fermentation and performance of dairy cows fed pomegranate peel extract. *Livestock Science*, *157*(2-3): 452-461. http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.002.
4. Abbas, S., Nada, A. A., & Mohamed, S. H. (2019). Effect of dietary pomegranate peel (*Punica granatum*) supplementation on productive performance and immune status of friesian dairy cows. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 22(2), 75-85. http://dx.doi.org/10.21608/ejnf.2019.102956.
5. Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y. S. D., & Heber, D. (2006). Pomegranate juice total pomegranate ellagitannins and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 980-985. http://dx.doi.org/10.1021/jf052005r.
6. Aguilar, C. N., Rodriguez, R., Gutierrez-Sanchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L. A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 47-59. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2.
7. Ahmed, S. T., & Yang, C. J. (2017). Effects of dietary *Punica granatum* L. by-products on performance, immunity, intestinal and fecal microbiology, and odorous gas emissions from excreta in broilers. *Journal of Poultry Science*, 54: 157-166, 2017. http://dx.doi.org/10.2141/jpsa.0160116.
8. AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

9. Bahaaldini, R., Khajavi, M., Naghiha, R., & Prsaei, S. (2018). Bioprocessing of acorn kernel with *Lactobacillus plantarum* to reduce its tannin. *Journal of Animal Science Research*, 28(2), 1-10. (In Persian).
10. Ben Salem, H., Abidi, S., Makkar, H., & Nefzaoui, A. (2005). Wood ash treatment, a cost-effective way to deactivate tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage and to improve digestion by Barbarine sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 93-108. http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.013.
11. Blummel, M., Steingga β H., & Becker, K. (1997). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77, 911-921. http://dx.doi.org/10.1079/BJN19970089
12. Brodrick, G.A., & Kang, J.H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8.
13. Brooker, J. D., O'Donovan, L. A., Skene, I., Clarke, K., Blackall, L., & Muslera, P. (1994). *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 313–323.
14. Brooker, M. I. H., & Kleinig, D. A. (2006). Field Guide to Eucalyptus. Vol. 1. South-eastern Australia, Third edition. Bloomings, Melbourne, Australia, 356 p.
15. Chaji, M., Direkvandi, E., & Salem, A. Z. (2020). Ensiling of *Conocarpus erectus* tree leaves with molasses, exogenous enzyme and *Lactobacillus plantarum* impacts on ruminal sheep biogases production and fermentation. *Agroforestry Systems*, 94, 1611-1623. http://dx.doi.org/10.1007/s10457-019-00436-x.
16. Chaudhary, L. C., Agarwal, N., Verma, V., Rikhari, K., & Kamra, D. N. (2011). Effect of feeding tannin degrading bacteria (Isolate-6) on rumen fermentation, nutrient utilization and growth performance of goats fed on *Ficus infectoria* leaves. *Small Ruminant Research*, 99(2-3), 143-147. http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.04.011.
17. Dehority, B. A. (2003). Rumen Microbiology.Nottingham University Press, Nottingham, UK. 372 p.
18. Eydipour, P. (2019). The effect of Conocarpus plant treated with tannase-producing bacteria on performance, digestibility and blood and ruminal factors of Arabi sheep. M.Sc. Thesis, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Molasani-Ahvaz, Iran. 100 pp. (In Persian).
19. Goel, G., & Makkar, H. P. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production*, 44(4), 729-739.
20. Goel, G., Puniya, A., Aguilar, C., & Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, 92, 497-503. http://dx.doi.org/10.1007/s00114-005-0040-7.
21. Hassan, Z. M., Manyelo, T. G., Selaledi, L., & Mabelebele, M. (2020). The Effects of tannins in monogastric animals with special reference to alternative feed ingredients. *Molecules*, 25, 4680. http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204680.
22. Hassanat, F., & Benchaar, C., (2013). Assessment of the effect of condensed (*Acacia and quebracho*) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 332-339. http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5763.
23. Hiura, T., Hashidoko, Y., Kobayashi, Y., & Tahara, S. (2010). Effective degradation of tannic acid by immobilized rumen microbes of a sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in winter. *Animal Feed Science and Technology*, 155(1), 1-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.09.015.
24. Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., & Wang, Y. (2018). Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4, 137-150. http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004.
25. Jadhav, U., Kadu, S., Thokal, N., Padul, M., Dawkar, V., Chougale, A., Salve, A., & Patil, M. (2011). Degradation of tannic acid by cold-adapted *Klebsiella sp*. NACASA1 and phytotoxicity assessment of tannic acid and its degradation products. *Environmental Science Pollution R*, 18, 1129-1138. http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0468-6.
26. Khorsandi, S., Riasi, A., Khorvash, M. (2018). Evaluating chemical composition, fatty acid profiles, antioxidant activity and nutritive value of pomegranate by-product using *in vitro* gas production technique. *Research on Animal Production*, 9 (22), 12. http://dx.doi.org/10.29252/rap.9.22.92.
27. Kumar, M., Beniwal, V., & Salar, R. K. (2015). Purification and characterization of a thermophilic tannase from *Klebsiella pneumoniae* KP715242. *Biocatalysis Agriculture Biotechnology,* 4(4), 745-751. http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.06.002.
28. Lim, Y. Y., & Murtijaya, J. (2007). Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by differen drying methods. *LWT-Food Science and Technology.* 40 (9), 1664-1669. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2006.12.013.
29. Makkar, H.P.S. (2003). Effects and fate tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49, 241-256. http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00142-1

30. McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., & Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 83–93. http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00232-2.
31. Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7–55.
32. Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., & Mcnabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology*,106(s1e4), 3e19. http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5.
33. Min, B. R., Hernandez, K., Pinchak, W.E., Anderson, R. C., Miller, J. E., & Valencia, E. (2015). Effects of plant tannin extracts supplementation on animal performance and gastrointestinal parasites infestation in steers grazing winter wheat. *Open Journal of Animal Sciences*, 5, 343-50. http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2015.53038.
34. Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N., Mansouri, H., Razeghi, M. E., Mirza-Aghazadeh, A., Cheraghi, H., & Aghajanzadeh-Golshani, A. (2011). Evaluating potential nutritive value of pomegranate processing by-products for ruminants using *in vitro* gas production technique. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(6), 45-51. http://dx.doi.org/10.1.1.1086.3991&rep=rep1&type=pdf
35. Mohammadabadi, T., Gheibipour, M., Motamedi, H., Chaji, M., & Abbas, B. A. (2021). Isolation and identification of tannin-degrading bacteria from deer gut and potency for improving nutritional value of tannin rich plants. *Iranian Veterinary Journal*, 17(1), 65-75. http://dx.doi.org/10.22055/IVJ.2021.257994.2322.
36. Mokhtarpour, A., Naserian, A., Valizadeh, R., & Tahmasbi, A. (2012). Effect of polyethylene glycol and urea treated pistachio by-products silage on phenolic compounds, *in vitro* gas production and Holstein dairy cow's performance. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 4(1), 55-62. (In Persian). http://dx.doi.org/10.22067/ijasr.v4i1.13912.
37. Molina, D. O., Pell, A. N., & Hogue, D. E. (1999). Effects of ruminal inoculations with tannin tolerant bacteria on fibre and nitrogen digestibility of lambs fed a high condensed tannic diet. *Animal Feed Science and Technology*, 81, 69-80. http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00083-8.
38. Mozafarian, V. (2005). Trees and shrubs in Iran. Pages 874-877 First ed. Fahang moaser, Tehran, Iran.
39. Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Zeller, W. E., & Huntley, N. F. (2017). The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 46(12), 929-949. http://dx.doi.org/10.1590/s1806-92902017001200009.
40. NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids, and camelids. Page 384. Washington, DC: National Academy of Science.
41. Orskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Food Engineering*, 80, 1-10. http://dx.doi.org/10.1017/S0021859600063048.
42. Orzuna-Orzuna, J. F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Mendoza-Martínez, G. D., Miranda-Romero, L. A., & Hernández-García, P. A. (2021). Effects of dietary tannins supplementation on growth performance, rumen fermentation, and enteric methane emissions in beef cattle: A meta-analysis sustainability, *Sustainability* 13(13), 7410. http://dx.doi.org/10.3390/su13137410.
43. Ozgen, M., Durgac, C., Serce, S., & Kaya, C. (2008). Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars Mediterranean grown in the region of Turkey. *Food Chemistry*, 111, 703-706. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.043.
44. Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198-1222. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010
45. Pell A. N., Woolston, T. K., Nelson, K. E., Schofield, P. (2000). Tannins: biological activity and bacterial tolerance. In: Brooker J. D. (ed) *Tannins in livestock and human nutrition*, Vol. 92. Pages 123–126. Proceedings of an international workshop, Adelaide, Australia, 31 May–2 June 1999.
46. Powell, M. C., Muntifering, R. B., Lin, J. C., & Chappelka, A. H. (2003). Yield and nutritive quality of sericealespedeza (*Lespedeza cuneata*) and little bluestem (*Schizachyrium scoparium*) exposed to ground level ozone. *Environmental Pollution*, 122(3), 313-322. http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00331-7.
47. Safari, O., Farhangi, M., Yakhchali, B., & Mehraban-Sang-Atash, M. (2012). The effect of fermentation process with *Lactobacillus plantarum* on reducing the anti-nutritional compounds of canola protein concentrate. *The Third National Conference on Agricultural Biotechnology in Iran*, 1-5. (In Persian).
48. Saha, S. S. & Ghosh, M. (2019). Comparative study of antioxidant activity of [alpha]-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2551-2556. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.012
49. Setiarto, R. H. B., & Widhyastuti, N. (2016). pengaruh fermentasi bakteri asam laktat terhadap sifat fisikokimia teung gadung modifikasi (*Dioscorea hispida*) Effect of lactic acid bacteria fermentation for physicochemical prperties of modified yam flour (*Dioscorea hispida*). *Journal Litbang Industri*, 6(1), 61-72.

http://dx.doi.org/10.24960/jli.v6i1.1134.61-72.

50. Sharifi, A., & Chaji, M. (2019a). Effects of processed recycled poultry bedding with tannins extracted from pomegranate peel on the nutrient digestibility and growth performance of lambs. *South African Journal of Animal Science*, 49 (1), 290-300.
51. Sharifi, A., & Chaji, M. (2019b). Effect of recycled poultry bedding treated with phenolic compounds extracted from pomegranate peel on *in vitro* digestion activity of rumen microbes. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 29(5), 1491-1500. http://www.thejaps.org.pk/.../32.pdf.
52. Sharifi, A., Chaji, M., & Vakili, A. (2019). Effect of treating recycled poultry bedding with tannin extracted from pomegranate peel on rumen fermentation parameters and cellulolytic bacterial population in Arabian fattening lambs. *Veterinary Research Forum*, 10(2), 145-152. http://dx.doi.org/10.30466/vrf.2019.75050.2007.
53. Sharma, D., Mal, G., Kannan, A., Bhar, R., Sharma, R., & Singh, B. (2017). Degradation of euptox A by tannase-producing rumen bacteria from migratory goats. *Journal of Applied Microbiology*, 123 (5), 1194-1202. http://dx.doi.org/10.1111/jam.13563.
54. Taher-Maddah, M., Maheri-Sis, N., Salamatdoustnobar, R., & Ahmadzadeh, A. (2012). Estimating fermentation characteristics and nutritive value of ensiled and dried pomegranate seeds for ruminants using *in vitro* gas production technique. *Open Veterinary Journal*, 2(1), 40-45.
55. Tahmourespour, A., Tabatabaei, N., Khalkhali, H., & Amini, I. (2016). Tannic acid degradation by *Klebsiella* strains isolated from goat feces. *Iranian Journal of Microbiology*, 8, 14. http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2017.21146.
56. Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., & Ho, Y. W. (2011). Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3-4), 185-193. http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004.
57. Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104-111. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x.
58. Van Soest, P. J., Roberson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
59. Yanez Ruiz, D. R., Moumen, A., Martin Garcia, A. I., Molina Alcaide, E. (2004). Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 82, 2023–2032. http://dx.doi.org/10.2527/2004.8272023x.
60. Yarahmadi, B., Chaji, M., Boujarpour, M., Mirzadeh, K., & Rezaei, M. (2017). Effects of sainfoin tannin treated by water or urea on microbial population, gas production parameters, digestibility and *in vitro* fermentation. *Iranian Veterinary Journal*, 13(3), 97-114. (In Persian). http://dx.doi.org/10.22055/IVJ.2017.42664.1625.